

PORÓWNANIE WZROSTU KOMÓREK MACIERZYSTYCH MIESZKÓW WŁOSOWYCH I SZPIKU KOSTNEGO DO WZROSTU KOMÓREK UROTELIALNYCH I FIBROBLASTÓW NA MATRYCY Z KOLAGENU TYPU I

Tomasz Drewa^{1,2}, Romana Joachimiak¹, Anna Kaznica¹, Joanna Wiśniewska-Skopińska³,
Alina Sionkowska³, Jan Sir⁴, Victoria Sarafian⁵, Joanna Łysik-Miśkurka^{4,6}

¹. Zakład Inżynierii Tkankowej, Katedra Biologii Medycznej,
Uniwersytet im. M. Kopernika, Bydgoszcz, Polska

². Katedra i Klinika Urologii Ogólnej, Onkologicznej i Dziecięcej,
Uniwersytet im. M. Kopernika, Bydgoszcz, Polska

³. Katedra i Zakład Chemii Ogólnej, Uniwersytet im. M. Kopernika, Toruń, Polska

⁴. Zakład Patologii, Centrum Onkologii, Bydgoszcz, Polska

⁵. Katedra i Zakład Biologii Medycznej, Uniwersytet Plovdiv, Plovdiv, Bułgaria

⁶. Katedra i Klinika Onkologii i Brachyterapii, Uniwersytet im. M. Kopernika,
Bydgoszcz,
Polska

Streszczenie

Zbudowanie ściany pęcherza moczowego z elementów pochodzących z poza układu moczowego jest wyzwaniem urologii rekonstrukcyjnej. Celem badania było porównanie wzrostu fibroblastów 3T3, komórek urotelialnych, komórek macierzystych mieszków włosowych i mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego na podłożu z kolagenu typu I szczura.

Materiał i metody. Do doświadczeń użyto szczurów rasy Wistar. Wyizolowano komórki nabłonka pęcherza moczowego i komórki macierzyste mieszków włosowych i komórki macierzyste mezenchymalne szpiku kostnego. Komórki te jak i fibroblasty 3T3 hodowano na podłożu DMEM (Sigma), wzbogaconym 10% (20% w przypadku mieszków) surowicą wołową płodową. Komórki nabłonkowe hodowano w obecności EGF. Komórki barwiono przy pomocy przeciwciał anti-cytokeratynowych (Clone MMF i anti-CK7), anti-CD34 i anti-p63 (Dako, Denmark). Podłoże z kolagenu przygotowano z szczurzych ogonów.

Kolagenem pokryto 6-dołkowe płytki do wzrostu komórek. Na jeden dołek płytki wysiewano 25×10^3 komórek i hodowano przez tydzień. Komórki w grupach kontrolnych hodowano na podłożu z polistyrenu. Po tygodniu żywotność komórek oceniano testem MTT (Sigma). Eksperymenty dla każdego typu komórek powtarzano 3-krotnie. Średnie porównano przy pomocy testu t-Studenta. Wykonano dokumentację fotograficzną.

Wyniki. Po 7 dniach hodowli zaobserwowano $106,5 \pm 23,4 \times 10^3$ i $310,7 \pm 60,7 \times 10^3$ fibroblastów 3T3, rosnących na podłożu odpowiednio z polistyrenu i kolagenu ($p < 0,05$). Komórki urotelialne barwiły się przeciwciałem przeciwko cytokeratynom (MMF i CK-7). Wykazano odpowiednio $40,0 \pm 4,2 \times 10^3$ i $4,5 \pm 1,8 \times 10^3$ rosnących na podłożu z polistyrenu i kolagenu ($p < 0,01$). Po 7 dniach hodowli zaobserwowano $118,5 \pm 19,7 \times 10^3$ i $114,1 \pm 33,2 \times 10^3$ macierzystych komórek mesenchymalnych szpiku kostnego, rosnących na podłożu odpowiednio z polistyrenu i kolagenu (NS). Komórki macierzyste mieszków włosowych wykazywały ekspresję markerów nabłonkowych oraz CD34 i p63 nawet po 40 pasażu. Wykazano odpowiednio $292,5 \pm 33,3 \times 10^3$ i $167,4 \pm 24,9 \times 10^3$ komórek mieszków włosowych, rosnących na podłożu z polistyrenu i kolagenu po 7 dniach hodowli ($p < 0,05$). Podłoże z kolagenu hamowało proliferację komórek mieszków włosowych i urotelialnych.

Wnioski. Komórki mieszków włosowych oraz komórki macierzyste szpiku kostnego mogą być potencjalnie użyte do konstrukcji ściany pęcherza moczowego, ponieważ hodowle te gwarantują odpowiednią liczbę prawidłowych komórek do zasiedlenia wszczepu. Wydaje się, że możliwe jest skonstruowanie fragmentu ściany pęcherza moczowego z elementów pochodzących z poza układu moczowego.

Słowa kluczowe: rusztowanie kolagenowe, komórki macierzyste mieszków włosowych, mesenchymalne komórki macierzyste szpiku, komórki urotelialne, fibroblasty 3T3, inżynieria tkankowa, regeneracja pęcherza moczowego

COMPARISON OF GROWTH OF THE FOLLICLE AND MESENCHYMAL STEM CELLS TO UROTHELIAL CELLS AND FIBROBLASTS ON COLLAGEN SCAFFOLD

Summary

To develop a tissue-engineered bladder wall replacement with elements obtained from non-urinary tract components is an attractive idea. The aim of this study was to compare growth of hair follicles epithelial stem cells and mesenchymal stem cells to urothelial cells and fibroblasts cells on scaffold prepared from rat collagen type I.

Materials and methods. Wistar rats were used in experiment. Rat urothelial cells, hair follicles epithelial stem cells, mesenchymal stem cells and 3T3 cells were cultivated in DMEM (Sigma) supplemented with 10% (or 20% for hair follicles cells) of Fetal Bovine Serum (FBS). Epithelial cell cultures were supplemented with EGF (10ng/ml; Sigma). Cells were stained using anty-cytokeratine (Clone MMF) and anty-cytokeratine 7. Anti-CD34 and anti-p63 staining were done. Collagen scaffold was prepared from tendons of Wistar rat's tails. 6-well plates were covered with collagen scaffold. 25×10^3 of cells were seeded on each well and cultured for a week. Cells in the controls were seeded on polystyrene surface. After a week cell viability was assessed using MTT test (Sigma). Each experiment was triplicated. Photo documentation was prepared. The differences between means were compared using t-Student test.

Results. There were $106.5 \pm 23.4 \times 10^3$ and $310.7 \pm 60.7 \times 10^3$ of 3T3 fibroblasts growing on polystyrene and collagen, respectively ($p < 0.05$). The initial cell number was 25.0×10^3 . Urothelial cells expressed epithelial markers. There were $40.0 \pm 4.2 \times 10^3$ and $4.5 \pm 1.8 \times 10^3$ urothelial cells growing on polystyrene and collagen, respectively after 7 days of culture ($p < 0.01$). There were $118.5 \pm 19.7 \times 10^3$ and $114.1 \pm 33.2 \times 10^3$ of mesenchymal stem cells growing on polystyrene and collagen, respectively (NS). Hair follicles epithelial cells expressed epithelial markers and were slightly positive for CD34 and p63. There were $292.5 \pm 33.3 \times 10^3$ and $167.4 \pm 24.9 \times 10^3$ of hair follicles epithelial cells growing on polystyrene and

collagen, respectively ($p < 0.05$). Collagen scaffold decreased proliferation of follicle epithelial and urothelial cells.

Conclusions. Hair follicles epithelial stem cells and mesenchymal stem cells can be potentially used in tissue-engineering, with the guarantee of the sufficient cell number for transplantation. It seems that construction *in vitro* of urinary bladder walls from elements obtained from non-urinary tract tissues is feasible.

Key words: collagen scaffold, hair follicle stem cells, mesenchymal stem cells, urothelial cells, 3T3 fibroblasts, tissue engineering, urinary bladder regeneration

WSTĘP

Metody inżynierii tkankowej stwarzają możliwości konstruowania tkanek *in vitro* celem ich późniejszego przeszczepiania. W 1999 roku zbudowano *in vitro* model zwierzęcy mięśnia wypieracza pęcherza moczowego. Źródłem komórek użytych do rekonstrukcji w tym doświadczeniu był pęcherz moczowy. Kontynuacja tych badań zaowocowała rekonstrukcją *in vitro* autologicznego mięśnia wypieracza pęcherza moczowego u siedmiu pacjentów. To doświadczenie jest jedynym na świecie eksperymentem, przedstawiającym możliwość rekonstrukcji *in vitro* mięśnia wypieracza pęcherza moczowego u człowieka. Rekonstrukcja ta została przeprowadzona przy pomocy autologicznych zróżnicowanych komórek nabłonkowych i mięśniowych, uzyskanych z pęcherza moczowego [1, 2]. Jednak najczęściej niemożliwe jest użycie komórek własnych chorego celem rekonstrukcji ściany pęcherza moczowego [3-6].

Odtworzenie pęcherza moczowego przy użyciu elementów (komórek oraz matrycy-rusztowania) z poza układu moczowego, jest ogromnym wyzwaniem urologii rekonstrukcyjnej. Ze względu na łatwy dostęp, mieszki włosowe jak i szpik kostny są atrakcyjnym źródłem komórek do regeneracji ściany pęcherza moczowego [7-10]. Kolagen typu I jest jednym z głównych składników błony podstawnej jak i macierzy zewnątrzkomórkowej ściany pęcherza moczowego i dlatego można go użyć do hodowli i przeszczepiania komórek. Przesłanki te stwarzają potencjalną możliwość konstrukcji *in vitro* ściany pęcherza, z elementów pochodzących z poza układu moczowego [11].

Celem pracy było porównanie wzrostu i proliferacji fibroblastów, komórek nabłonka pęcherza moczowego, mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego i komórek macierzystych mieszków włosowych na podłożu z kolagenu typu I.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto komórek pobranych od zwierząt uśpionych w innych eksperymentach, gdzie zwierzęta te służyły jako grupy kontrolne.

Hodowla komórek fibroblastów mysich 3T3. Fibroblasty 3T3 hodowano w medium DMEM/Ham's-F12, 10% FBS, 5 µg/ml amfoterycyny B, 100 u/ml, 100 µg/ml penicyliny/streptomycyny oraz L-glutaminy.

Izolacja i hodowla komórek urothelium (nabłonka pęcherza moczowego) szczura. Pobrany pęcherz moczowy szczura rasy Wistar umieszczono w PBS z antybiotykami i trawiono w 0,01% roztworze kolagenazy I przez 4-5 godz. w temp. 37°C. Po okresie trawienia, pęcherz rozcięto i delikatnie zeszkrobano warstwę komórek nabłonka pęcherza moczowego. Komórki wirowano przez 10 min. przy 2000 obr/min., a następnie policzono i posiano. Hodowlę prowadzono w pożywce DMEM/Ham's-F12, 10% FBS, 10ng/ml EGF, 5 µg/ml amfoterycyny B, 100 u/ml, 100 µg/ml penicyliny/streptomycyny oraz L-glutaminy. Komórki urotelialne hodowano bez warstwy odżywczej fibroblastów.

Izolacja i hodowla mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (MSC) szczura. Pobrano kości udowe szczura. Po odcięciu dystalnych części kości udowych wypłukano szpik kostny przy użyciu medium (DMEM/Ham's-F12). Wypłukany szpik kostny uzupełniono PBS, a następnie wirowano dwukrotnie 10 min. przy 2000 obr/min. Komórki zawieszono w medium, policzono i posiano. Komórki hodowano w DMEM/Ham's-F12 zawierającym 10% FBS, 10ng/ml bFGF, 5 µg/ml amfoterycyny B, 100 u/ml, 100 µg/ml penicyliny/streptomycyny oraz L-glutaminy.

Izolacja i hodowla komórek macierzystych mieszków włosowych szczura. Wycięto fragment skóry wraz z mieszkami szczurzych wąsów czuciowych i umieszczono je w PBS z antybiotykami. Wycięto mieszki, starannie usuwając otaczające je tkanki i inkubowano w roztworze dispazy (1mg/ml) w temp. 4°C przez 14 godzin. Tak wypreparowane mieszki umieszczono w roztworze trypsyny (0,25%) w temp. 37°C na 20 min. Po inaktywacji trypsyny mieszki przeniesiono na płytki 6-dołkowe. Komórki hodowano w DMEM/Ham's-F12 zawierającym 20% FBS, 10ng/ml EGF, 5µg/ml trójjodotyroniny, 5mg/ml insuliny,

0.4mg/ml hydrokortyzonu, 5 µg/ml amfoterycyny B oraz 100 u/ml/100µg/ml penicyliny/streptomycyny z L-glutaminą.

Przygotowanie podłoża z kolagenu typu I. Kolagen typu I wypreparowano ze ścięgien ogonowych młodych szczurów rasy Wistar. Ogony szczurze pocięto na kawałki i wyjęto ścięgna. Wyizolowane włókna przemyto kilkakrotnie wodą dejonizowaną i umieszczono w 0,1 M roztworze kwasu octowego na około 72 godz. w temp. 8°C. Zanieczyszczenia oraz nierozpuszczalne części tkanki odwirowano za pomocą wirówki Eppendorf Centrifuge 5804 R, z prędkością 10.000 obrotów/min. w temp. 8°C. Otrzymany roztwór zdekantowano.

Ocena wzrostu komórek na podłożu z kolagenu typu I. Płytki 12-dołkowe pokrywano kolagenem (1ml kolagenu/ dołek). Po zastygnięciu dołki obsiewano fibroblastami linii 3T3, komórkami nabłonka pęcherza moczowego (po 1 pasażu), mezenchymalnymi komórkami szpiku kostnego (po 3 pasażu) oraz komórkami macierzystymi mieszków włosowych (po 5 i wyższych pasażach). Liczba komórek wysiewanych na jeden dołek była stała i wynosiła 25×10^3 komórek. Hodowle prowadzono przez 7 dni, medium zmieniano co 2 dzień. Po 7 dniach hodowli żywotność komórek oceniono przy użyciu testu MTT (Sigma, Niemcy). Po usunięciu medium komórki przemyto roztworem PBS, a następnie dodano roztwór MTT (0.5mg MTT/1ml PBS). Komórki inkubowano 3 godz. w temp. 37°C. Po okresie inkubacji usunięto roztwór MTT, powstałe kryształy formazanu rozpuszczono w DMSO. Absorbancję odczytano w spektrofotometrze przy długości fali 570nm. Dla każdego typu komórek doświadczenie powtarzano 3-krotnie. Różnice między średnimi liczbami komórek rosnącymi na badanych podłożach porównano testem t-Studenta.

WYNIKI

Początkowa liczba komórek we wszystkich grupach wynosiła $25,0 \times 10^3$ /dołek. Fibroblasty 3T3 proliferowały na obu podłożach bardzo intensywnie. Liczba fibroblastów rosnących na rusztowaniu kolagenowym była prawie 3 razy większa, w porównaniu do liczby komórek rosnących na podłożu polipropylenowym. Po 7 dniach hodowli zaobserwowano $106,5 \pm 23,4 \times 10^3$ i $310,7 \pm 60,7 \times 10^3$ fibroblastów 3T3, rosnących na podłożach odpowiednio z polistyrenu i kolagenu ($p < 0,05$; ryc.1 i 2).

Komórki nabłonka pęcherza moczowego szczura, barwiły się przeciwciałami przeciwko cytokeratynom o szerokim spektrum (clone MMF) oraz przeciw cytokeratynie 7 (wyników nie przedstawiono). Komórki nabłonka pęcherza moczowego proliferowały wolno.

Po 7 dniach hodowli wykazano odpowiednio $40,0 \pm 4,2 \times 10^3$ i $4,5 \pm 1,8 \times 10^3$, rosnących na podłożach odpowiednio z polistyrenu i kolagenu ($p < 0,01$; ryc.3 i.4).

Nie obserwowano różnic w proliferacji mesenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego. Po 7 dniach hodowli zaobserwowano $118,5 \pm 19,7 \times 10^3$ i $114,1 \pm 33,2 \times 10^3$ macierzystych komórek mesenchymalnych szpiku kostnego, rosnących na podłożach odpowiednio z polistyrenu i kolagenu ($p = 0,4$; ryc.5 i 6).

Komórki mieszków włosowych wykazywały ekspresję markerów nabłonkowych (clone MMF). Hodowle komórek mieszków włosowych wykazywały ekspresję białek CD34 i p63 nawet po 40 pasażu (wyników nie przedstawiono). Komórki te proliferowały bardzo szybko. Po 7 dniach hodowli wykazano odpowiednio $292,5 \pm 33,3 \times 10^3$ i $167,4 \pm 24,9 \times 10^3$ komórek rosnących na podłożach odpowiednio z polistyrenu i kolagenu ($p < 0,05$; ryc. 7 i 8).

DYSKUSJA

Nie udowodniono do tej pory, które matryce służące do hodowania i przeszczepiania komórek najlepiej nadawałyby się do odtworzenia ściany pęcherza moczowego. Kolagen jest kluczowym składnikiem rusztowań używanych w urologii rekonstrukcyjnej. Ksenogeniczne bezkomórkowe matryce pochodzące ze ściany jelita cienkiego (SIS - Small Intestine Submucosa) lub pęcherza moczowego (BAM – Bladder Acellular Matrix) zawierające kolageny typów I, III i IV, znalazły zastosowanie w chirurgii rekonstrukcyjnej [12,13]. Doświadczenia *in vivo*, jak i pierwszy eksperyment kliniczny nie faworyzują żadnego z podłoży (rusztowań) stosowanych do wzrostu i przeszczepiania komórek. Eksperymenty prowadzi się dwutorowo i dotyczą one sztucznych biodegradowalnych polimerów wzbogaconych kolagenem, jak i matryc uzyskiwanych z macierzy zewnątrzkomórkowej (SIS i BAM). Komórki nabłonkowe i zrębowe rosną na matrycach zbudowanych ze świńskiego kolagenu typu I [1, 2, 14-16]. Matryca z końskiego kolagenu wspomaga proces tworzenia naczyń krwionośnych [17].

Obserwowany słaby wzrost komórek urotelialnych na matrycy kolagenowej, wiązać się może z brakiem warstwy odżywczej, która jest rutynowo stosowana w przypadku hodowli komórek nabłonkowych. Autorzy pracy nie stosowali warstwy odżywczej komórek z tego względu, iż wpływa ona negatywnie na zmiany zachodzące w DNA hodowanych tą metodą komórek urotelialnych. W badaniach *in vitro* udowodniono, że komórki zachowują fenotyp komórek urotelialnych właśnie na materiałach biogennych, zawierających kolagen. Matryca zawierająca kolagen wszyta w ścianę pęcherza, ulega *in vivo* pokryciu nabłonkiem pęcherza

moczowego. Z drugiej strony w obserwacjach długoterminowych wykazano, iż nie obsiana przed wszczepieniem komórkami matryca kolagenowa może ulegać w organizmie gospodarza kalcyfikacji i włóknieniu. W przypadkach tych stwierdza się brak włókien mięśniowych oraz zmniejszoną objętość pęcherza po rekonstrukcji.

Są to wszystko negatywne zmiany, które uniemożliwiają prawidłową rekonstrukcję ściany pęcherza moczowego [18, 19]. Zrekonstruowana przy pomocy matrycy zawierającej kolagen (SIS) ściana pęcherza moczowego szczura, wykazywała prawidłowe warstwy komórek jedynie wówczas, gdy wcześniej wyhodowano komórki macierzyste na matrycy, nie zaś w przypadku, gdy do rekonstrukcji użyto matrycy bezkomórkowej [7, 20]. Dlatego wydaje się, iż komórki odgrywają zasadniczą rolę w metodach rekonstrukcji tkanek i narządów. Badanie wzrostu komórek różnych linii i typów na matrycach *in vitro*, daje możliwość wstępnej oceny tych matryc i umożliwia przewidywanie zachowania się komórek w warunkach *in vivo* po przeszczepieniu ich na badanej matrycy [21].

W przedstawionym badaniu wykazano, iż matryca z kolagenu typu I hamuje wzrost komórek nabłonkowych pęcherza moczowego i mieszków włosowych, a nasila wzrost fibroblastów przy braku wpływu na proliferację komórek mezenchymalnych szpiku kostnego. Analizując otrzymane wyniki można przypuszczać, iż zarówno komórki macierzyste mieszków włosowych, jak i mezenchymalne szpiku hodowane na rusztowaniu zawierającym kolagen typu I, mogą potencjalnie zostać użyte do rekonstrukcji ściany pęcherza moczowego.

Prawdopodobnie matryca z kolagenu I wpływa również na różnicowanie komórek nabłonkowych, przy prawdopodobnym braku wpływu na różnicowanie komórek pochodzenia mezenchymalnego. Hipotezę tę należałoby potwierdzić w innych badaniach. Hodowla komórek urotelialnych bez warstwy odżywczej charakteryzuje się wolną proliferacją (ryc.3 i 4), a komórki nabłonkowe hodowane *in vitro* z użyciem substancji mitogennych i warstwy odżywczej, tracą swój pierwotny prawidłowy fenotyp. Fenotyp ten może zostać przywrócony po zaprzestaniu używania środków mitogennych, co z kolei powoduje zwolnienie proliferacji [22, 23].

Wykazano po raz pierwszy, że komórki macierzyste mieszków włosowych będą prawdopodobnie lepiej nadawały się do celów rekonstrukcyjnych w urologii niż komórki nabłonka pęcherza moczowego, które w przypadku pozbawienia ich w hodowli silnych czynników mitogennych proliferują bardzo wolno. Komórki macierzyste mieszków włosowych proliferują szybko, zarówno na podłożu z polipropylenu jak i na rusztowaniu kolagenowym, mimo braku silnych i często kancerogennych mitogenów (ryc. 5-8). Wydaje się również, iż hodowle komórek macierzystych mieszków włosowych na obu testowanych

podłożach nie wymagają stosowania warstw odżywczych. Komórki zróżnicowane zastosowano do regeneracji ludzkiego pęcherza moczowego, chociaż wydaje się, iż mają one ograniczone możliwości stosowania. Komórek urotelialnych nie można stosować w przypadku wielu chorób wymagających rekonstrukcji pęcherza moczowego [11].

Zupełnie inaczej przedstawiają się możliwości regeneracji z użyciem komórek macierzystych. Ludzkie macierzyste komórki embrionalne, nasilają migrację komórek mięśniowych i nabłonkowych pęcherza moczowego *in vitro*. Komórki macierzyste mogą mieć korzystny wpływ na regenerację ściany pęcherza moczowego [7, 9]. W pracy tej przedstawiono podobne wyniki, dotyczące proliferacji komórek macierzystych na rusztowaniu zbudowanym z kolagenu typu I. Rekonstrukcja nabłonka przy pomocy komórek macierzystych mieszków włosowych oraz warstwy mięśniowej z komórek mezenchymalnych szpiku kostnego pozwoliłaby uniknąć używania komórek zróżnicowanych, których liczba do rekonstrukcji pęcherza moczowego jest często zbyt mała. Z kolei wiadomo, że liczba komórek macierzystych użyta do regeneracji tkanek nie musi być tak wielka, ponieważ regeneracja z udziałem komórek macierzystych odbywa się wielotorowo. Komórki te stanowią masę wszczepu oraz nasilają procesy regeneracji, a także mobilizują inne komórki gospodarza poprzez prawdopodobnie wpływ na ich taksję w miejsce gojenia [2, 7, 9, 24, 25].

WNIOSKI

1. Rusztowanie zbudowane z kolagenu typu I warunkuje prawidłową proliferację komórek macierzystych szpiku kostnego i mieszków włosowych.

2. Komórki macierzyste szpiku kostnego i mieszków włosowych rosnące na matrycy zawierającej kolagen typu I, potencjalnie mogą zostać wykorzystane do rekonstrukcji ściany pęcherza moczowego.

LITERATURA

[1] Oberpenning F., Meng J., Yoo J. J., Atala A.: De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat. Biotechnol.*, (1999), 17, 149-155.

[2] Atala A., Bauer S. B., Soker S., Yoo J. J., Retik A. B.: Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*, (2006), 367, 1241-1246.

- [3] Solsona E., Iborra I., Ricos J. V., Monros J. L., Rubio J., Almenar S.: Clinical panurothelial disease in patients with superficial bladder tumors: therapeutic implications. *J. Urol.*, (2002), 167, 2007-2011.
- [4] Stein J. P., Clark P., Miranda G., Cai J., Groshen S., Skinner D. G.: Urethral tumor recurrence following cystectomy and urinary diversion: clinical and pathological characteristics in 768 male patients. *J. Urol.*, (2005), 173, 1163-1168.
- [5] Akkad T., Gozzi C., Deibl M., Muller T., Pelzer A. E., Pinggera G. M., Bartsch G., Steiner H.: Tumor recurrence in the remnant urothelium of females undergoing radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: long-term results from a single center. *J. Urol.*, (2006), 175, 1268-1271.
- [6] Sanderson K. M., Cai J., Miranda G., Skinner D. G., Stein J. P.: Upper tract urothelial recurrence following radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: an analysis of 1,069 patients with 10-year followup. *J. Urol.*, (2007), 177, 2088-2094.
- [7] Chung S.Y., Krivorov N. P., Rausei V., Thomas L., Frantzen M., Landsittel D., Kang Y. M., Chon C. H., Ng C. S., Fuchs G. J.: Bladder reconstitution with bone marrow derived stem cells seeded on small intestinal submucosa improves morphological and molecular composition. *J. Urol.*, (2005), 174, 353-359.
- [8] Brehmer B., Rohrmann D., Rau G., Jakse G.: Bladder wall replacement by tissue engineering and autologous keratinocytes in minipigs. *BJU Int.*, (2006), 97, 829-836.
- [9] Zhang Y., Lin H. K., Frimberger D., Epstein R. B., Kropp B. P.: Growth of bone marrow stromal cells on small intestinal submucosa: an alternative cell source for tissue engineered bladder. *BJU Int.*, (2005), 96, 1120-1125.
- [10] Kanematsu A., Yamamoto S., Ogawa O.: Changing concepts of bladder regeneration. *Int J. Urol.*, (2007), 14, 673-678.
- [11] Southgate J., Varley C. L., Garthwaite M. A., Hinley J., Marsh F., Stahlschmidt J., Trejdosiewicz L. K., Eardley I.: Differentiation potential of urothelium from patients with benign bladder dysfunction. *BJU Int.*, (2007), 99, 1506-1516.

- [12] Badylak S. F.: Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl. Immunol.*, (2004), 12, 367-377.
- [13] Badylak S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, (2007), 28, 3587-3593.
- [14] Campodonico F., Benelli R., Michelazzi A., Ognio E., Toncini C., Maffezzini M.: Bladder cell culture on small intestinal submucosa as bioscaffold: experimental study on engineered urothelial grafts. *Eur. Urol.*, (2004), 46, 531-537.
- [15] Brown A. L., Brook-Allred T. T., Waddell J. E., White J., Werkmeister J. A., Ramshaw J. A., Bagli D. J., Woodhouse K. A.: Bladder acellular matrix as a substrate for studying in vitro bladder smooth muscle-urothelial cell interactions. *Biomaterials*, (2005), 26, 529-543.
- [16] Bolland F., Korossis S., Wilshaw S. P., Ingham E., Fisher J., Kearney J. N., Southgate J.: Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering. *Biomaterials*, (2007), 28, 1061-1070.
- [17] Danielsson C., Ruault S., Basset-Dardare A., Frey P.: Modified collagen fleece, a scaffold for transplantation of human bladder smooth muscle cells. *Biomaterials*, (2006), 27, 1054-1060.
- [18] Kropp B. P., Cheng E.Y., Lin H. K., Zhang Y.: Reliable and reproducible bladder regeneration using unseeded distal small intestinal submucosa. *J. Urol.*, (2004), 172, 1710-1713.
- [19] Lu S. H., Sacks M. S., Chung S.Y., Gloeckner D. C., Pruchnic R., Huard J., de Groat W. C., Chancellor M. B.: Biaxial mechanical properties of muscle-derived cell seeded small intestinal submucosa for bladder wall reconstitution. *Biomaterials*, (2005), 26, 443-449.
- [20] Fraser M., Thomas D. F., Pitt E., Harnden P., Trejdosiewicz L. K., Southgate J. A.: Surgical model of composite cystoplasty with cultured urothelial cells: a controlled study of gross outcome and urothelial phenotype. *BJUInt.*, (2004), 93, 609-616.
- [21] Skopińska-Wiśniewska J., Sionkowska A., Joachimiak R., Kaźnica A., Drewa T., Bajer K., Dzwonkowski J.: Biomateriały na bazie kolagenu i hydrolizatów elastyny modyfikowane promieniowaniem UV. *Inżynieria Biomateriałów*, (2007), 69-72, 67-69.
- [22] Kurzrock E. A., Lieu D.K., deGraffenried L.A., Isseroff R. R.: Rat urothelium: improved techniques for serial cultivation, expansion, freezing and reconstitution onto acellular

matrix. J. Urol., (2005), 173, 281-285.

[23] Staack A., Hayward S. W., Baskin L. S., Cunha G. R.: Molecular, cellular and developmental biology of urothelium as a basis of bladder regeneration. Differentiation, (2005), 73, 121-133.

[24] Chunmeng S., Tianmin C., Yongping S., Xinze R., Yue M., Jifu Q., Shufen L., HuiX., Chengji L.: Effects of deral multipotent cell transplantation on skin woundhealing. J. Surg Res., (2004), 121, 13-19.

[25] Dow J., Simkhovich B.Z., Kedes L., Kloner R.A. Washout of transplanted cells from the heart: a potential new hurdle for cell transplantation therapy. Cardiovasc Res., (2005), 67, 301-307.

T. Drewa zaprojektował doświadczenie, odpowiadał za hodowlę komórek, zanalizował wyniki i przygotował manuskrypt; **R. Joachimiak i A. Kaznica** wyhodowały komórki i przygotowały matryce pokryte komórkami oraz oceniły żywotność komórek; **J. Wisniewska-Skopińska i A. Sionkowska** przygotowały matryce z kolagenu; **V. Sarafian, J. Sir i J. Łysik-Miśkurka** przeprowadzili analizę cytologiczną.

Adres autorów

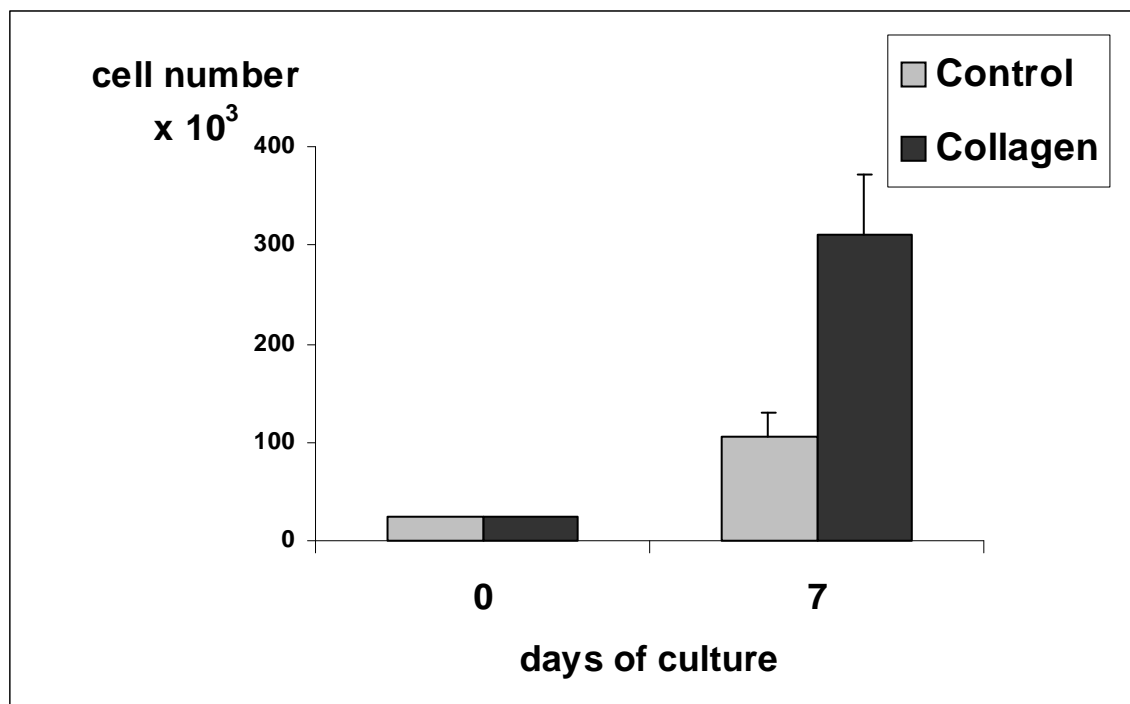
Zakład Inżynierii Tkankowej

Katedra Biologii Medycznej

ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

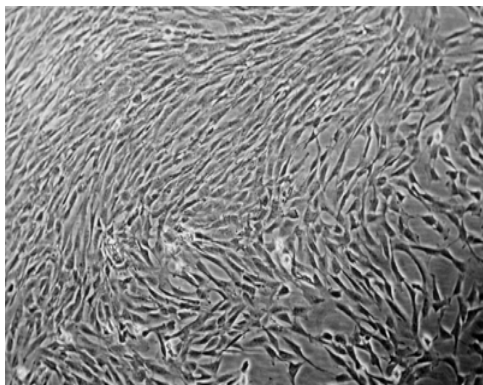
Tel. +48525853737; Fax. +48525853742

E-mail: tomaszdrewa@wp.pl

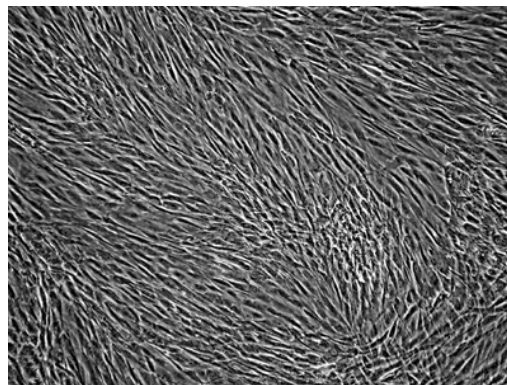


Ryc.1. Po 7 dniach hodowli zaobserwowano $106,5 \pm 23,4 \times 10^3$ i $310,7 \pm 60,7 \times 10^3$ fibroblastów 3T3 rosnących na podłożu odpowiednio z polistyrenu i kolagenu ($p < 0,05$). Początkowa liczba komórek wynosiła $25,0 \times 10^3$

Fig.1. There were $106.5 \pm 23.4 \times 10^3$ and $310.7 \pm 60.7 \times 10^3$ of 3T3 fibroblasts growing on polystyrene and collagen, respectively ($p < 0.05$). The initial cell number was 25.0×10^3



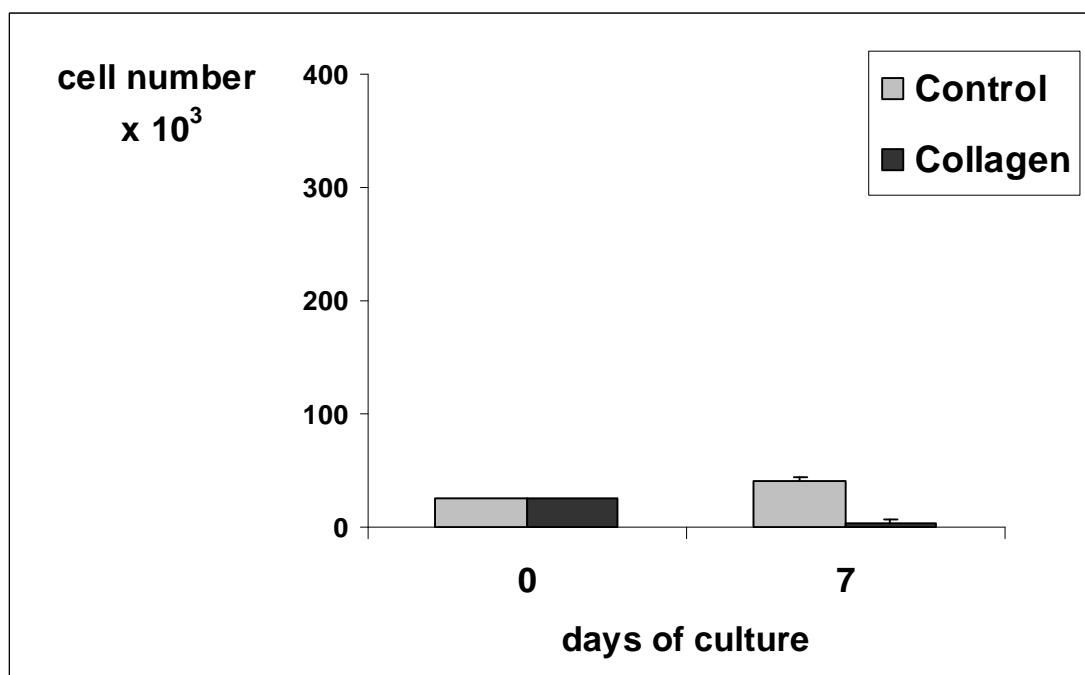
A.



B.

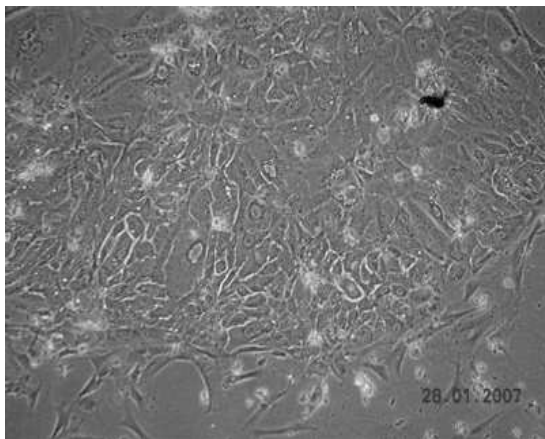
Ryc. 2. Fibroblasty proliferujące na podłożu z polistyrenu (A, kontrola, 7 dzień, pow.150x) oraz na podłożu z kolagenu (B, 7 dzień, pow.150x, mikroskop odwrócony)

Fig. 2. Fibroblasts proliferated on polistyren (A, control, the 7th day, mag.150x) and on collagen (B, the 7th day, mag. 150x, inverted microscope)

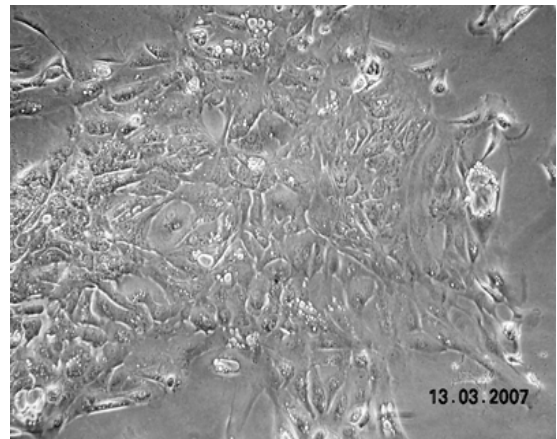


Ryc. 3. Po 7 dniach hodowli zaobserwowano $40,0 \pm 4,2 \times 10^3$ i $4,5 \pm 1,8 \times 10^3$ komórek urothelialnych rosnących na podłożu odpowiednio z polistyrenu i kolagenu ($p < 0,01$). Początkowa liczba komórek wynosiła $25,0 \times 10^3$

Fig. 3. There were $40.0 \pm 4.2 \times 10^3$ and $4.5 \pm 1.8 \times 10^3$ urothelial cells growing on polystyrene and collagen, respectively after 7 days of culture ($p < 0.01$). The initial cell number was 25.0×10^3



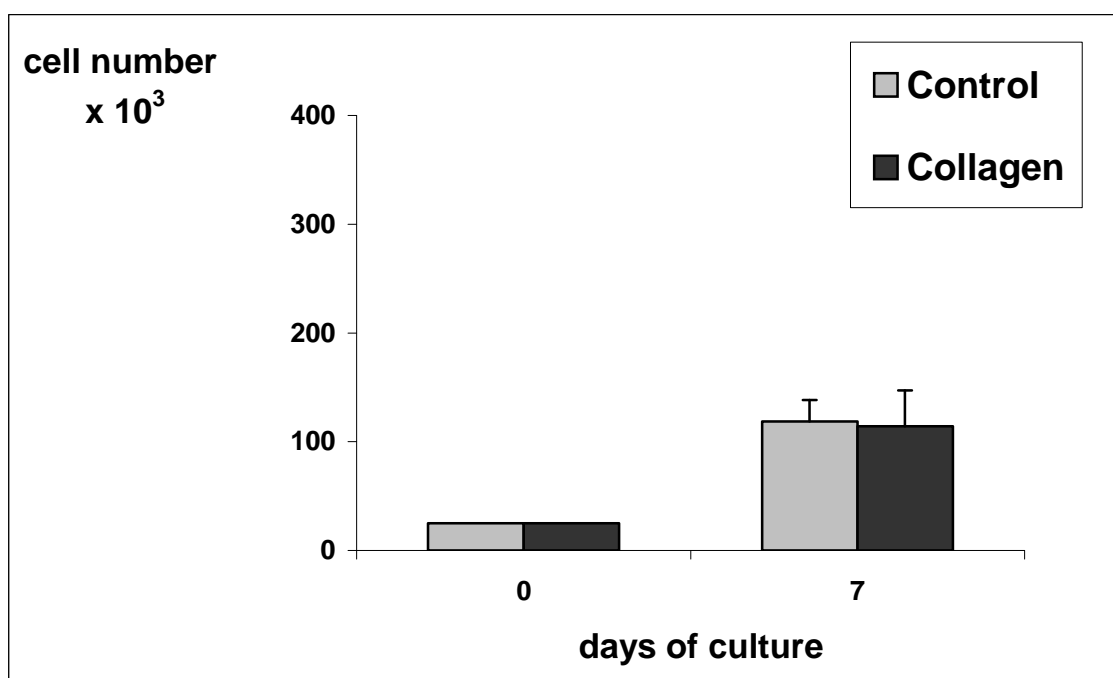
A.



B.

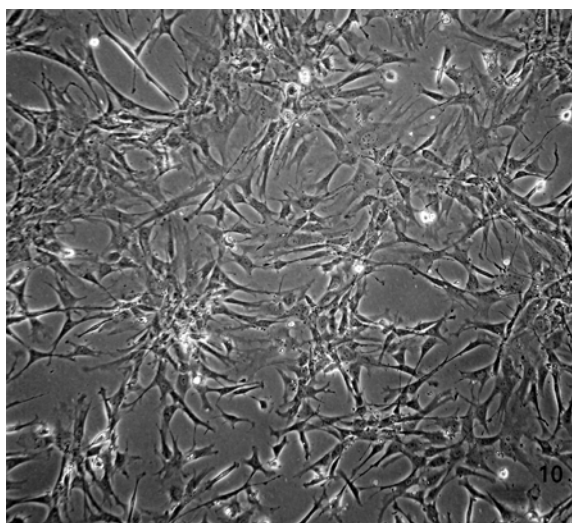
Ryc. 4. Komórki nabłonka pęcherza moczowego proliferujące na podłożu z polistyrenu (A, kontrola, 7 dzień, pow.150x) oraz na podłożu z kolagenu (B, 7 dzień, pow.150x, mikroskop odwrócony)

Fig. 4. Urothelial cells proliferated slowly and did not form monolayers on polystyren (A, control, the 7th day, mag.150x) nor on collagen (B, the 7th day, mag. 150x, inverted microscope).

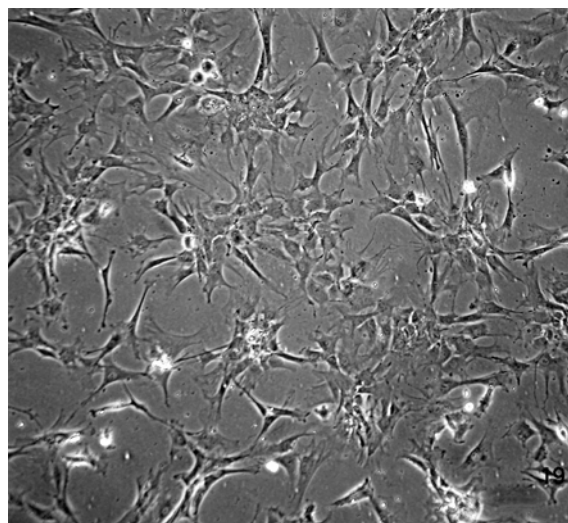


Ryc. 5. Po 7 dniach hodowli zaobserwowano $118,5 \pm 19,7 \times 10^3$ i $114,1 \pm 33,2 \times 10^3$ macierzystych komórek mesenchymalnych szpiku kostnego rosnących na podłożu odpowiednio z polistyrenu i kolagenu (NS). Początkowa liczba komórek wynosiła $25,0 \times 10^3$.

Fig. 5. There were $118.5 \pm 19.7 \times 10^3$ and $114.1 \pm 33.2 \times 10^3$ of mesenchymal stem cells growing on polystyrene and collagen, respectively (NS). The initial cell number was 25.0×10^3 .



A.



B.

Ryc. 6. Mesenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego proliferowały bardzo szybko na podłożu z polistyrenu (A, kontrola, 7 dzień, pow.150x) oraz na podłożu z kolagenu (B, 7 dzień, pow.150x, mikroskop odwrócony)

Fig. 6. Mesenchymal stem cells proliferated very quickly on polistyren (A, control, the 7th day, mag.150x) and on collagen as well (B, the 7th day, mag. 150x, inverted microscope)

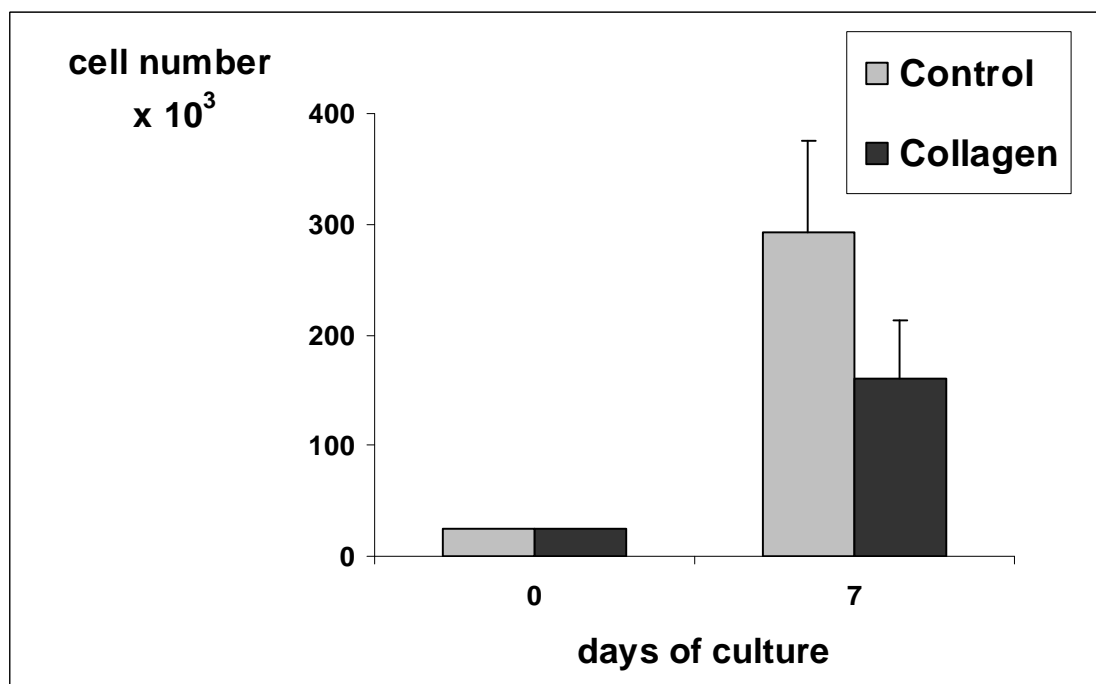
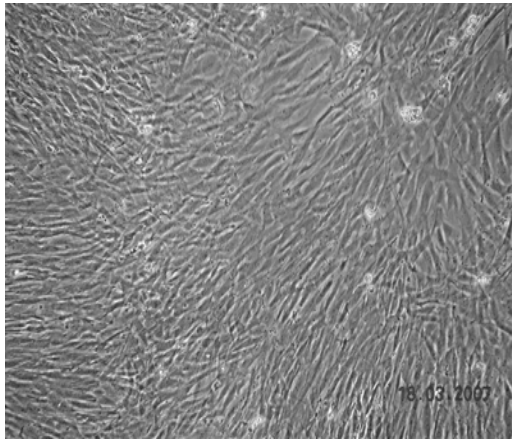
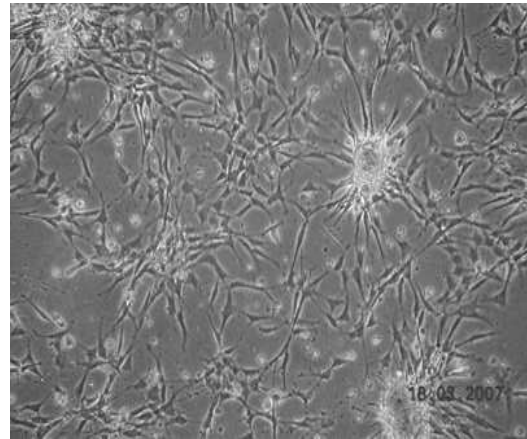


Fig. 7. Po 7 dniach hodowli zaobserwowano $292,5 \pm 33,3 \times 10^3$ i $167,4 \pm 24,9 \times 10^3$ komórek macierzystych mieszków włosowych rosnących na podłożu odpowiednio z polistyrenu i kolagenu ($p < 0,05$). Początkowa liczba komórek wynosiła $25,0 \times 10^3$

Fig. 7. There were $292.5 \pm 33.3 \times 10^3$ and $167.4 \pm 24.9 \times 10^3$ of hair follicles epithelial cells growing on polystyrene and collagen, respectively ($p < 0.05$). The initial cell number was 25.0×10^3



A.



B.

Ryc. 8. Komórki macierzyste mieszków włosowych proliferujące na podłożu z polistyrenu (A, kontrola, 7 dzień, pow.150x) oraz na podłożu z kolagenu (B, 7 dzień, pow.150x, mikroskop odwrócony)

Ryc. 8. Hair follicles epithelial cells proliferated very quickly on polistyren (A, control, the 7th day, mag.150x) and on collagen as well (B, the 7th day, mag. 150x, inverted microscope)

